

Extraction of poly(beta -hydroxy butyric acid)

Patent Number: ☐ US4358583
Publication date: 1982-11-09
Inventor(s): WALKER JOHN; WHITTON JONATHAN R
Applicant(s): ICI PLC
Requested Patent: JP57065193
Application Number: US19810287807 19810728
Priority Number(s): GB19800026460 19800813
IPC Classification: C08G63/72
EC Classification: C12P7/62A
Equivalents:

Abstract

Poly (beta -hydroxy butyric acid), PHB, is extracted from a suspension of bacterial cells by causing the cells to flocculate, by pH modification, optionally with heating, and then extracting the PHB from the flocculated cells with a suitable extraction solvent. Flocculation of the cells renders subsequent separation of the PHB solution from the cell debris more facile. Preferably lipids are extracted from the flocculated cells before contact with the PHB extraction solvent.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—65193

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/42

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)4月20日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

⑯ 特 願 昭56—127312

⑰ 出 願 昭56(1981)8月13日

優先権主張 ⑱ 1980年8月13日 ⑲ イギリス (GB) ⑳ 8026460

㉑ 発 明 者 ジョン・ウオーカー
イギリス国クリーブランド・スト
ットクトン・オン・ティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

㉒ 発 明 者 ジョナサン・リチャード・ホイ

ットン

イギリス国クリーブランド・ス
トットクトン・オン・ティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

㉓ 出 願 人 インペリアル・ケミカル・イン
ダストリーズ・リミテッド
イギリス国ロンドン市エスタブ
リユー1ビー3ジェイエフ・ミ
ルバンク・インペリアル・ケミ
カル・ハウス(番地なし)

㉔ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. [発明の名称]

菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

2. [特許請求の範囲]

(1) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を含む細菌の菌体を、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を可溶性溶剤と接触させ、そしてポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を溶解して含む溶剤を菌体破片層から分離することにより、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)含有菌体の水性懸濁液からポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を分離する方法であつて：水性懸濁液中の菌体を、懸濁液のpHを酸での処理により2～5の範囲内の値に下げる工程と、それと組合せた(i)上記酸性化前に水性懸濁液のpHを8～12の範囲内の値に上げるために水性懸濁液をアルカリで処理する工程および(ii)上記酸性化の前もしくは後に水性懸濁液を50～200℃の範囲内の温度に加熱する工程の少なくとも一方とによつて、凝集させ、次いで凝集菌体を水性懸濁液から分離してからその菌

体を抽出溶剤と接触させる；ことを特徴とする細菌の菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法。

(2) 懸濁液のpHを8.5～12の範囲内の値に上げ；その懸濁液中に加圧下のスチームを射出することにより加熱し；次いで懸濁液を3～5の範囲内のpHにまで酸性化する；ことにより懸濁液中の菌体を凝集させることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) 菌体懸濁液をスチームの射出により60～100℃の範囲内の温度に加熱することを特徴とする特許請求の範囲第1または2項に記載の方法。

(4) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤との接触前に、細菌の菌体に関連した脂質を、該脂質を溶解しうるがポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を溶解しえない溶剤との接触により凝集菌体から抽出し、そして脂質を溶解して含む該溶剤を凝集菌体から分離除去することを特徴とする特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。

(5) 凝集菌体を40～90℃の範囲内の温度で菌

質抽出用溶剤と接触させる特許請求の範囲第4項に記載の方法。

(6) 脂質抽出用溶剤はアセトンまたはメタノールである特許請求の範囲第4または5項に記載の方法。

(7) 脂質抽出後かつポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤との接触前に、凝集菌体を乾燥させることにより多孔性顆粒状物とし、これをポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4～6項のいずれかに記載の方法。

(8) 凝集菌体を脂質抽出溶剤から分離後に、凝集菌体を水でスラリー化してからポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4～6項のいずれかに記載の方法。

(9) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤はクロロホルム、1, 2-ジクロルエタンおよび塩化メチレンから選択されたものである特許請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。

の抽出溶剤としては、環式カーボネート類、例えば1, 2-プロピレンカーボネート(米国特許第4,101,538号参照); クロロホルム(米国特許第3,275,160号参照); および1, 2-ジクロルエタン(欧州特許出願第15128号明細書参照)がある。

米国特許第3,275,610号明細書には、その他の菌体破壊法、すなわち超音波振動法、磨砕法、フレンチプレス法、凍結/凍解サイクル法およびリゾチウム処理法が記載されているが、前記の欧州特許出願明細書に記載されているような、菌体懸濁液(例えば水性培地中で微生物を適当な炭素およびエネルギー源で培養することにより得られるような菌体懸濁液)の噴霧乾燥またはフラッシュ乾燥でも、PHBを菌体から抽出可能とするに十分な菌体破壊が生じうる。

これらの方法の欠点は、PHB含有溶液を菌体破砕層から分離する必要があることである。菌体の寸法が微小であり、従つて菌体の破片の寸法が微小である故に、おぼろげな分離法では従来

3. [発明の詳細な説明]

本発明は、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)(以下PHBと略記する)の抽出に関する。

PHBはプラスチック材料として有用な熱可塑性ポリエステルである。PHBは細菌の菌体内において顆粒状のエネルギー保存物質として多量の細菌によつて蓄積される。

PHB含有菌体はそのまま成形用材料として使用できるが(例えば米国特許第3,107,172号明細書参照)、菌体物質の残部からPHBを分離することが一般に文献に記載されている。

このようなPHB分離を行うのに提案されている諸方法の中には、アセトンでの処理のような方法によつて菌体を破壊し、次いでPHBを可溶性溶剤で処理することにより菌体から抽出する方法がある。このような方法の実例は、溶剤として塩化メチレンおよびエタノールの混合物またはピリジンを用いる米国特許第3,038,454号および第3,044,942号明細書に記載の方法である。菌体中で産生された形態にあるPHB用のその他

から問題があつた。このような難点は、クロロホルムを溶剤として利用する場合におけるようにPHB含有溶液が比較的粘稠であるときに顕著である。前述の欧州特許出願明細書に記載されるように、若干の場合には、水性懸濁液を、適当な菌体破壊工程の後に、適当なPHB用溶剤と接触させ、次いで溶剤相と水性相とに分離させることからなる湿式方法によつて、PHBを抽出しうる。しかしながら溶剤/水性両相の分離は遅くしかも不完全でありうる。

ここに我々は、菌体懸濁液を凝集工程に付すならば、その凝集に必要とされる処理中に十分な菌体破壊が生じて菌体破砕層からのPHBの抽出を可能とすることを発見した。また菌体凝集の結果として、菌体破砕層からのPHB含有溶液の分離が一層容易に達成しうる。

従つて、本発明によれば、PHB含有菌体の水性懸濁液からPHBを分離する方法であつて、懸濁液のpHを酸での処理により2～5の範囲内の値とし、かつ懸濁液を酸性化前にアルカリで処理

してそのpHを8~12の範囲内の値に上げ、および/または酸性化前もしくは後に50~200℃の範囲内の温度に加熱することにより懸濁液を凝集させ；凝集菌体を水性媒体から分離し；凝集菌体を、PHBを可溶性溶剤と接触させることにより凝集菌体からPHBを抽出し；そしてPHBを溶解して含む溶剤を菌体破片屑から分離する；ことからなる上記PHB分離方法が提供される。

そのような凝集法は英国特許第1,082,005号および第1,381,306号明細書に記載されている。好ましくは、懸濁液のpHを8.5~12の値に上げ、懸濁液中に加圧スチームを射出して加熱し、次いで3~5のpHにまで酸性化することにより懸濁液を凝集させる。

スチームの量および温度は、菌体懸濁液の温度を60~100℃にまで上昇させるようなものであるのが好ましい。

凝集された菌体は濾過、沈降、浮遊、遠心分離または乾燥処理（例えば噴霧乾燥）により水性媒体から分離しうる。

が有利でありうる。

脂質抽出工程（もし採用するならば）および/またはPHB抽出工程は、適当な床に充填された凝集菌体について連続的に実施してよい。

本発明の好ましい一態様においては、脂質抽出後に、例えば流動床乾燥機で、凝集菌体を乾燥させる。このようにすると比較的多孔性の顆粒状物質が得られ、このものを次いでPHB抽出用溶剤と接触させることができる。我々は、このような顆粒物質を用いると、PHBがそれから容易に析出され、菌体破片屑が顆粒状のまま残ることを発見した。このような顆粒状の菌体破片屑は濾過のような方法によつて、PHB含有溶液から容易に分離できる。脂質抽出済の凝集菌体の乾燥によつて得られる多孔性顆粒物質は、PHB用溶剤をその顆粒物質床内を下向きに透過させて実施する細流（トリクル）抽出法に特に適当である。

本発明の別の態様においては、凝集菌体を、前述のような脂質抽出工程に対し、脂質抽出溶剤から分離し、次いで水に再スラリー化させる。かく

PHB抽出用溶剤との接触前に、凝集菌体を、菌体に関連した脂質を溶解しうるがPHBを溶解しえない溶剤と接触させるのが好ましい。そのような脂質抽出用溶剤の例としてはメタノールおよびアセトンがある。脂質の抽出は、昇温、例えば40~90℃で行うのが好ましいけれども、若干の場合には一層低い例えば25~40℃の温度でも十分な脂質抽出を行いうることがある。一般的には昇温の使用が好ましく、上記のような昇温を用いる場合には、凝集菌体は脂質抽出用溶剤中で沈降し易く、かくしてデカンテーションのような方法での凝集菌体と脂質抽出溶剤の分離を助長する傾向がある。

菌体を次いでPHB抽出用溶剤と接触させる。好ましい抽出用溶剤の例としては、1, 2-ジクロロエタン、塩化メチレンおよびクロロホルムがある。脂質抽出予備処理を行わない場合には、PHBの抽出は約40℃以下の温度で行うのが好ましいが、脂質抽出予備処理を行う場合には一層高い温度、例えば50~90℃の温度を用いるの

して得られるスラリーは、水と非混和性であるがPHBを溶解しうる液体をそのスラリーに添加することにより、湿式抽出法（前述の欧州特許出願第15123号明細書参照）で処理しうる。

一般的には、さらに追加の菌体破壊処理（例えば前述の欧州特許出願第15123号明細書において若干の場合に使用するために提案されているミーリング処理）は、凝集菌体が一旦脂質抽出工程に付された場合には不要である。

水性スラリーをPHB抽出用溶剤と共に攪拌した後に、二つの液相を分離させる。菌体破片屑は水性相に残留するが、PHBは溶剤相中に溶解される。前述のPHB抽出用溶剤、すなわちクロロホルム、1, 2-ジクロロエタンおよび塩化メチレンを、この湿式法によりPHBを抽出するのに使用できる。

湿式抽出前に脂質除去工程を行うので、二つの液相間でのエマルジョンの形成は防止され、両者の分離は比較的簡単である。

PHBは、抽出溶剤の蒸発から、非溶解、例え

はメタノール／水混合物中への沈降により、または溶剤の蒸発、例えば噴霧またはフラッシュ乾燥により、回収できる。

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

実施例 1

150g/lのバイオマス含量（そのうちの約45wt%はPHB）のアルカリゲネス・エクトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) の水性懸濁液を、アルカリの添加によりそのpHを9とし、90℃に10分間加熱し、次いでpH5に酸性化することにより、凝集させた。得られたフロックをデカンテーションにより水性媒質から分離した。

その凝集フロック100mlを200mlのメタノールに加え5分間遠流した。次いでデカンテーションによりメタノールを除去し、得られたフロックを流動床にて60℃で20分間乾燥した。顆粒状の生成物が形成された。

顆粒状生成物の10gを200mlのクロロホルムで5分間遠流処理してPHBを抽出した。菌体破片層は顆粒状であり、クロロホルム溶液の上面

に浮いており、容易にそこからすくい取ることができる。

PHBを含むクロロホルム溶液をメタノールと水の混合物（メタノール：水＝4：1容積比）に加えることによりそのクロロホルム溶液からPHBを沈降させた。沈降PHBを濾過により回収し、オープン中40℃で乾燥した。回収されたPHB量はアルカリゲネス・エクトロフス菌体中のその約8.0wt%に相当した。

回収PHBの重量平均分子量は、ゲル透液クロマトグラフィーで測定して270,000であつた。

比較例

比較のために、20.0mlのクロロホルムで10gの乾燥菌体（上記水性懸濁液の噴霧乾燥により得た）を遠流処理することによりPHB抽出した。菌体破片層は微細粒子状であり、このものはクロロホルム溶液から非常に困難に分離できた。

実施例 2

実施例1を繰返したが、クロロホルムで顆粒状物を遠流する代りに顆粒状物をシルバーソニ-

ミキサー中でクロロホルムと室温で混合した。菌体破片層は、比較例2よりもクロロホルム溶液から容易に分離できたが、実施例1の場合よりも分離が困難であつた。

回収PHBの量は、菌体中のその約5.0wt%に相当した。

実施例 3

米国特許第3,086,959号明細書には湿潤菌体をアセトンで処理してから、PHB抽出用溶剤で抽出することが提案されている。示唆されているアセトンの量は、菌体重量の1～10倍である。

アセトンの効果を検討するため、約5重量%の菌体（そのうちの約5.0wt%がPHB）を含む水性懸濁液の試料に対し、異なる量のアセトンを添加し、それらの混合物を室温で2分間遠とうした。

試料	アセトン ml	菌体懸濁液 ml	結 果
A	10	90	認めうる効果なし。
B	50	50	菌体は部分的に凝集した外観を呈したが、液相からの菌体の分離は生じなかつた。
C	90	10	菌体は部分的に凝集した外観を呈した、約2.5mlの容積を占めて沈降した。

湿潤菌体または菌体懸濁液をアセトンで処理する場合、大規模操業ではアセトン／水性媒質混合物からアセトンを回収する必要が生ずるであろうから、乾燥菌体に対するアセトンの効果を検討した。

噴霧乾燥菌体（比較例で用いたもの）、または空気乾燥菌体（すなわち実施例1で用いた懸濁液から遠心分離および40℃の空気中での流動床乾燥により分離した菌体）の種々の量を、100mlのアセトンと共に室温で2分間かきまぜ、その懸濁液を1時間静置した。菌体は凝集した外観を有

しないが、下表に示すようにある程度まで沈降した。

試料	菌体のタイプ	菌体の重量 (g)	沈降菌体の量 (g)
D	噴霧乾燥	2	痕 跡
E	"	5	約2
F	"	10	約8
G	風 乾	2	痕 跡
H	"	5	約1
I	"	10	約5~6

試料CまたはFの沈降菌体をデカンテーションで分離し、乾燥し、クロロホルムで逆流処理したとき、クロロホルム溶液からの菌体破片屑の分離は比較例よりも容易ではなかつた。

特許出願人 インペリアル・ケミカル・
インダストリーズ・リミテッド

代 理 人 弁 理 士 湯 浅 恭 三

(外2名)

第1頁の続き

優先権主張 ③1980年12月23日③イギリス
(GB)③8041182

⑦発 明 者 バリー・アルダーソン
イギリス国クリーブランド・ス
トックトン・オン・テーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)